مقایسه تنوع ژنتیک برخی ژنوتیپ‌های لایم اسیدی جمعیت میناب با کاربرد AFLP

شاهین جهانگیرزاده خیاوی[*1]، بهروز گلعین[2]، رضوان نجمی[2]

[*1] پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران، [2] پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران.

[*]نویسنده مسئول: shjahangirzadeh@gmail.com

چکیده

لایم‌های اسیدی از دیر باز در مناطق جنوبی ایران کشت و کار می‌شده‌اند و نقش مهمی در اقتصاد منطقه جنوب دارند. پس از نمونه‌برداری برگی‌های جوان کاملا بالغ شده، DNA ژنومی استخراج گردید. از نشانگر AFLP با کاربرد شش ترکیب پرایمری حاصل از آغازگرهای *Eco*RI و *Mse*I برای بررسی روابط ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ بومی از منطقه میناب و سه رقم وارداتی استفاده شده است. در مجموع این ترکیب‌ها، تولید ۱۷۳ باند قابل نمره‌دهی کردند که ۵۹/۵۴٪ حالت چندشکلی داشتند. میزانPIC محاسبه شده برای تمام ترکیب‌ها از ۰/۴۰ تا ۰/۴۹ با متوسط ۰/۴۶ بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار Popgene صورت گرفت. بر اساس این داده‌ها میزان شاخص شانون (I)، ضریب تشابه نی (h)، تنوع ژنتیکی کل در جمعیت‌ها (Ht)، تنوع درون جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst) به ترتیب ۰/۴۶، ۰/۳۰، ۰/۳۶، ۰/۲۷ و ۰/۲۵بدست آمدند. نتایج این بررسی نشان داد که مابین جمعیت های لیموی اسیدی به دلیل انکه اکثرا بصورت جنسی تکثیر شده‌اند تنوع بالایی وجود دارد.

کلمات کلیدی: لیمو، میناب، نشانگر مولکولی، AFLP، ترکیب پرایمری

مقدمه

جنس مرکبات که شامل تعدادی از مهمترین میوه‌های دنیا است به خانواده Rutaceae تعلق دارد. آب و هوای ایران به ویژه در استان های جنوبی شرایط مطلوبی را برای کاشت مرکبات فراهم نموده است که همین مورد باعث ایجاد گوناگونی زیادی در مرکبات ایران گردیده است. در سال‌های اخیر با توجه به پیشرفت‌هایی که در زمینه کاربرد نشانگرهای مولکولی ایجاد شده است از این امکانات نیز در تشخیص و شناسایی مرکبات استفاده‌های زیادی شده است.

نشانگرهای گوناگونی از جمله آیزوزایم‌ها،RFLP، ISSR، RAPD، SSR و AFLP برای محاسبه تنوع ژنتیکی جنس مرکبات و جنس‌های وابسته بکار رفته‌اند (Abedinpour *et al*., 2014، Al-Sadi *et al*., 2012، Campos *et al*., 2005، Golein *et al*., 2012، Nematollahi *et al*., 2013، Khiavi *et al*., 2015 و Khiavi *et al*., 2016). اگر چه روش AFLP تا سال ۱۳۸۵ شمسی (۲۰۰۷ میلادی) برای تجزیه و بررسی فیلوژنی در مرکبات استفاده نشده بود (Pang *et al*., 2007)، اما این روش نشان داده است که می‌تواند به عنوان یک تکنیک قدرتمند برای شناسایی و تخمین تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنی در جمعیت‌های مرکبات باشد (Al-Sadi *et al*., 2012، Nartvaranant and Nartvaranant, 2011، Pang *et al*., 2007 و Khiavi *et al*., 2015). در این تحقیق سعی شده است نسبت به بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ژنوتیپ‌های بومی لیموهای اسیدی مربوط به منطقه میناب و مقایسه آنها با سه رقم تجاری، اقدام گردد.

مواد و روش‌ها

برگ‌های جوان بالغ از ۱۵ ژنوتیپ لیموهای اسیدی منطقه میناب و سه رقم مکزیکن لایم (*C. auranifolia*)، پرشین لایم (*Citrus × latifolia*) و بالنگ (*C. medica*) از باغ تحقیقاتی موسسه مرکبات ایران در رامسر تهیه شده و تا زمان استفاده در فریز ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جدول ۱ اطلاعات نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد.

IrHC2019

استخراج DNA ژنومی بر اساس دستور العمل معرفی شده توسط شرکت Diversity Arrays Technology Pty Ltd کشور استرالیا صورت گرفت (www.diversityarrays.com).

جدول۱. نمونه‌های لیمو اسیدی بکار رفته در بررسیAFLP

کد نمونه	محل جمع آوری	نام علمی	کد نمونه	محل جمع آوری	نام علمی
M1-1	میناب	*Citrus* sp.	M2-8	میناب	*Citrus* sp.
M1-3	میناب	*Citrus* sp.	M2-10	میناب	*Citrus* sp.
M1-4	میناب	*Citrus* sp.	M4-2	میناب	*Citrus* sp.
M1-5	میناب	*Citrus* sp.	M4-5	میناب	*Citrus* sp.
M1-7	میناب	*Citrus* sp.	M5-2	میناب	*Citrus* sp.
M1-10	میناب	*Citrus* sp.	M1-5	میناب	*Citrus* sp.
MI1-13	میناب	*Citrus* sp.	S37	رامسر	*Citrus aurantifolia*
M1-14	میناب	*Citrus* sp.	S51	رامسر	*Citrus* × *latifolia*
M2-2	میناب	*Citrus* sp.	S54	رامسر	*Citrus medica*

روش AFLP بر اساس دستور العمل وس و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات صورت پذیرفت (Khiavi et al., 2015). جدول ۲ اطلاعات ترکیب‌های پرایمری بکار رفته را بیان می‌دارد. فقط نوارهای تشکیل شده کاملا مشخص و مطمئن امتیازدهی شدند (حضور (۱) یا عدم حضور (صفر)). بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک جهت آنالیز جمعیتی نیز از نرم افزار POPGENE,Ver.32 استفاده گردید. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بر اساس رابطه PICi=2fi(1-fi) که برای نشانگرهای غالب توصیه شده است، محاسبه شد.

جدول ۲. اسامی ترکیب‌های آغازگری AFLP بکار رفته در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ نمونه‌های لیموی اسیدی، تعداد نوارهای تکثیری، تعداد نوارهای چند شکل، درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات چند شکلی برای آنها

نام ترکیب	کد ترکیب	تعداد نوار چندشکل	تعداد نوار یک شکل	تعداد کل نوارهای تکثیری	درصد چند شکلی	محتوای اطلاعات چندشکلی
ECGC*MAGA	C1	۲۱	۱۲	۳۳	۶۳,۶۴	۰,۴۵
ECCA*MAGA	C2	۱۴	۱۲	۲۶	۵۳,۸۵	۰,۴۳
ECCA*MAGT	C3	۱۷	۱۰	۲۷	۶۲,۹۶	۰,۴۵
ECGC*MAAG	C4	۲۰	۱۰	۳۰	۶۶,۶۷	۰,۴۹
ECCG*MAAG	C5	۲۱	۱۲	۳۳	۶۳,۶۴	۰,۴۰
ECAG*MAAG	C6	۱۰	۱۴	۲۴	۴۱,۶۷	۰,۴۸
کل	-	۱۰۳	۷۰	۱۷۳	۵۹,۵۴	۰,۴۶

نتایج و بحث

در این تحقیق در ابتدا تعداد نه ترکیب متفاوت پرایمری بر روی شش نمونه تصادفی انتخاب شده مورد بررسی قرار گرفتند که شش ترکیب پرایمر به علت داشتن درصد چندشکلی بالاتر برای بررسی تنوع ۱۸ نمونه لیموی اسیدی مورد استفاده قرار گرفتند اسامی ترکیب‌ها، تعداد کل باندها، تعداد باندهای چندشکل، درصد چند شکلی و محتوای

IrHC2019

اطلاعات چند شکلی برای هر ترکیب پرایمری در جدول ۲ ارائه شده است. در مجموع ۱۷۳ ناحیه ژنومی تکثیر شدند که ۱۰۳ نوار (۵۹/۵۴٪) چند شکلی داشتند. تعداد نوار برای هر ترکیب پرایمری از ۲۴ تا ۳۱ بود که متوسط نوار چند شکل تکثیر شده به ازای هر ترکیب پرایمر معادل ۱۷ بود. دقت در میزان محتوای چند شکلی حاصل شده در مطالعه حاضر، بیانگر این حقیقت است که کارایی قابل توجه ترکیب‌های پرایمری بکار رفته با توجه به میزان درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات چند شکلی، می‌تواند برای بررسی تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها مناسب باشد. در بررسی جمعیتی نمونه‌ها، میزان شاخص شانون (I)، ضریب تشابه نی (h)، تنوع ژنتیکی کل در جمعیت‌ها (Ht)، تنوع درون جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst) به ترتیب ۰/۴۶، ۰/۳۰، ۰/۳۶، ۰/۲۷ و ۰/۲۵بدست آمدند. جدول‌های ۳ و ۴ اطلاعات بدست آمده از تجزیه جمعیتی نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهند.

جدول ۳. تعداد نمونه در هر جمعیت، متوسط تعداد نوار مشاهده شده، متوسط تعداد نوار مؤثر، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص تنوع ژنتیکی شانون در جمعیت‌ها و کل جمعیت

جمعیت	تعداد نمونه درون هر جمعیت	متوسط تعداد نوارمشاهده شده (na)	متوسط تعداد نوار موثر (ne)	شاخص تنوع ژنتیکی نی (h)	شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I)
نمونه‌های منطقه میناب	۱۵	۱/۶۰	۱/۴۵	۰/۲۵	۰/۳۵
ارقام	۳	۱/۷۴	۱/۵۱	/۲۹	۰/۴۳
کل	۱۸	۱/۹۹	۱/۵۲	۰/۳۰	۰/۴۶

جدول ۴. شاخص‌های تنوع کل جمعیت، تنوع درون زیر جمعیت‌ها، تنوع بین زیر جمعیت‌ها محاسبه

	تعداد نمونه	تنوع کل (ht)	تنوع درون جمعیت (hs)	تنوع بین جمعیت (Gst)	جریان ژنی (mn)
میانگین	۱۸	۰/۳۵۸	۰/۲۶۷	۲۵۳	۱/۴۷۶
انحراف از معیار	-	۰/۰۱۸	۰/۰۱۷	-	-

منابع

Abedinpour, H., Ranjbar, G.A., Babaeian Jelodar, N. and Golein, B. 2014. Assessment of polymorphism in citrus genotypes using RAPD molecular markers. Plant Products Research Journal, 21 (4): 165-178. (In Persian)

Al-Sadi, A.M., Al-Moqbali, H.S., Al-Yahyai, R.A. and Al-Said, F.A. 2012. AFLP data suggest a potential role for the low genetic diversity of acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) in Oman in the outbreak of witches' broom disease of lime. Euphytica, 188:285–297

Campos, E.T., Espinosa, M.A.G., Warburton, M.L., Varela, A. S. and Monter, A. V. 2005. Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. Interciencia, 687-693.

Goleina, B., Bigonah, M., Azadvar, M. and Golmohammadid, M. 2012. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (Citrus sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. Scientia Horticulturae, 148: 147–153.

http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/pub/DArT_DNA_isolation.pdf
bfw.ac.at/200/1859.html

Nematollahi, A.Kh., Golein, B. and Vahdati, K. 2013. Analysis of the genetic diversity in Citrus (*Citrus* spp.) species using SSR markers. Journal of Plant Physiology and Breeding, 3, 41-49.

Khiavi, S.J., Hamid oghli, Y., Golein, B., and Sabouri, A. 2016. Assessment of Genetic Diversity in Some Limes in Three Regions of Iran, Using Morphological and ISSR Markers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 4(3): 18-29.

Khiavi, S.J., Hamid oghli, Y., Golein, B., and Sabouri, A. 2015. Evaluation of genetic diversity in Acid Lime (Citrus aurantifolia Swingle) genotypes using AFLP Markers. Australian Journal of Crop Science, 9(10): 996-1002.

Pang, X.M., Hu, Ch.G. and Deng, X.X. 2007. Phylogenetic relationships within Citrus and its related genera as inferred from AFLP markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54:429–436.

Nartvaranant, P. and Nartvaranan. K. 2011. Analysis based on AFLP markers of the genetic variations and their relationships for pummelo cultivars grown in the central region of Thailand. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 33 (5), 499-508.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., De Lee, T.V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 2: 4407-4414

Comparison of Genetic Diversity of some Acid Lime Genotypes frome Minab Population by Using AFLP

Shahin Jahangirzadeh Khiavir[1]*, Behroz Golein[1], Rezvan Najmi[1]

[1*] Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran; [2] Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran

**Corresponding Author: shjahangirzadeh@gmail.com*

Abstract

Limes have been cultivated in the southern regions of Iran for a long time and play an important role in the economy of the southern region. After selecting young and well expanded leaves, their genomic DNA were extracted. AFLP method was done by using six primer combinations of *Eco*RI and *Mse*I for studding of Genetic relationship between 15 local genotypes from Minab and three imported cultivars. All combinations produced 173 scorable bands that had %59.54 polymorphism. Polymorphic information content (PIC) was measured 0.40 to 0.49 for all combinations with an average of 0.46. Data were analyzed using POPGENE software. According to AFLP data, Shannon's Information index (I), Nei's gene diversity (h), total genetic diversity in populations (Ht), major portion of it was within populations (Hs) and genetic differentiation among populations (Gst) were calculated 0.46, 0.30, 0.36, 0.27 and 0.25 (respectively). Results of this study showed that Iranian acid lime population have high level of genetic diversity because they were propagated sexually.

***Keywords*:** Lime, Minab, Molecular Markers, AFLP, Primer combination

IrHC2019